

JP00/5843

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

31.08.00	
REC'D 20 OCT 2000	
WIPO	PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年11月22日

E.K.U.

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第330924号

出願人
Applicant (s):

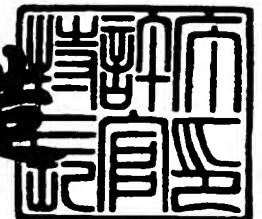
三洋電機株式会社

PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年10月 6日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3080907

【書類名】 特許願
 【整理番号】 NAR0990039
 【提出日】 平成11年11月22日
 【あて先】 特許庁長官殿
 【国際特許分類】 C12Q 1/00
 【発明者】

【住所又は居所】 大阪府守口市京阪本通 2 丁目 5 番 5 号 三洋電機株式
 会社内

【氏名】 井上 高一

【特許出願人】

【識別番号】 000001889

【氏名又は名称】 三洋電機株式会社

【代表者】 近藤 定男

【代理人】

【識別番号】 100109368

【弁理士】

【氏名又は名称】 稲村 悦男

【連絡先】 電話 0 3 - 3 8 3 7 - 7 7 5 1 法務・知的財産部
 東京事務所

【選任した代理人】

【識別番号】 100111383

【弁理士】

【氏名又は名称】 芝野 正雅

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第262590号

【出願日】 平成11年 9月16日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013033

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9904451

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腸内細菌叢の分析方法及び分析装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被験者の腸内細菌叢を分析する方法であって、
被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を特定の P C R プライマーを用いて増幅させる核酸増幅工程と、

前記核酸増幅工程において得られた増幅断片に基づき腸内細菌叢を分析する分析工程とを含むことを特徴とする腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 2】 前記分析工程には、前記増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、前記分画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 3】 前記分析工程には、複数のプローブを用いて前記増幅断片とハイブリッド形成を行わせ、その形成の有無から腸内細菌叢の分析が行われることを特徴とする請求項 1 に記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 4】 前記プローブは、検出部中の特定の位置に配置されていることを特徴とする請求項 3 に記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 5】 前記核酸増幅工程で用いた P C R プライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとすること特徴とする請求項 4 に記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 6】 前記核酸増幅工程において得られた核酸は、前記検出部への導入前に変性せしめることを特徴とする請求項 4 に記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 7】 前記検出部の設定温度は、温度制御部からの命令により任意に変更できることを特徴とする請求項 4 に記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 8】 前記特定の P C R プライマーが、前記腸内細菌の 16 S r R N A をコードした核酸領域を増幅し得る配列を有していることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の腸内細菌叢の分析方法。

【請求項 9】 前記特定のプライマーが特定の増幅確率を有するプライマーであることを特徴とする請求項 1 ～ 7 のいずれかに記載の腸内細菌叢の分析方法

【請求項 1 0】 腸内細菌叢を分析するための装置であって、
被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、
前記増幅された核酸を電気泳動により分画する電気泳動部と、
前記電気泳動部において分画された泳動パターンから腸内細菌叢を解析する解析部とを有することを特徴とする腸内細菌叢の分析装置。

【請求項 1 1】 腸内細菌叢を分析するための装置であって、
被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、
前記増幅された核酸と特定のプローブとをハイブリッド形成させるハイブリッド形成部と、
前記ハイブリッド形成の結果から腸内細菌叢を解析する解析部とを有することを特徴とする腸内細菌叢の分析装置。

【請求項 1 2】 前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなるプローブが配列された DNA チップが備えられていることを特徴とする請求項 7 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

【請求項 1 3】 前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなる特定のプローブが特定の位置に配置された検出部が備えられていることを特徴とする請求項 1 1 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

【請求項 1 4】 前記核酸増幅部で用いた PCR プライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとすること特徴とする請求項 1 3 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

【請求項 1 5】 前記検出部の前段には、核酸を変性せしめる DNA 変性部を設けることを特徴とする請求項 1 3 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

【請求項 1 6】 前記検出部の設定温度を任意に変更できる温度制御部を備えることを特徴とする請求項 1 3 に記載の腸内細菌叢の分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、被験者の腸内細菌叢（腸内フローラ）を分析するための方法及び装

置に関する。

【0002】

【従来の技術】

腸内には腸内細菌と呼ばれる常在細菌類が存在し、この細菌類の分布状態を腸内細菌叢という。腸内細菌には、Enterobacteriaceaeに属する大腸菌と近縁のSalmonella等、また、Bacteroides、Eubacterium、Bifidobacterium、Peptostreptococcus、Clostridium、Lactobacillusなどが含まれる。

【0003】

これら腸内細菌は、食物の消化に補助的な役割を果たす他、外来の病原菌の発育を抑制するなどの体調の維持に役立っているが、このような腸内細菌叢は、各個体において一定ではなく、宿主の年齢、食物習慣などにより変化する。また、同一の個体においても、疾病や精神的なストレスなどによって変化する事が知られている。

【0004】

こうした腸内細菌叢を分析する場合に、従来は、培養法が利用されてきた。すなわち、被験者の糞便などの試料を選択培地又は非選択培地などに植菌し、各細菌の生育条件に合わせて、各培地を培養し、成長した細菌を染色等により細菌の性質に基づいて各腸内細菌が同定されていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、腸内細菌群は100種類にも及ぶといわれており（「腸内フローラとプロバイオティクス（INTESTINAL FLORA AND PROBIOTICS）」, Proceedings of V. Symposium of Intestinal Flora, Tokyo, 1996, 学会出版センター）、これら多数の腸内細菌群を培養法により分析することが極めて困難であり、分析可能な細菌の範囲も限定されることになる。また、一定の細菌群の範囲については分析が可能であるとしても、多数の細菌を培養し同定するためには、時間と労力の係る作業であった。

【0006】

一方、細菌にも、それぞれの細菌の特質が記録された遺伝情報が、DNAとし

て染色体にコードされている。これら細菌の特性の違いは、この遺伝情報を司る染色体上の配列に反映され、細菌ごとに特徴的な配列が存在する。

【0007】

一例として、細菌のリボソーマルRNAの16SrRNAサブユニットをコードした16SrDNAでは、細菌間で異なり、この配列の相違により細菌を同定することができることが示されている(Christineら、Appl. Environ. Microbiol. 65:102-109)。

【0008】

そこで、本発明は、前記課題に鑑みてなされたものであり、その目的は、腸内細菌間の核酸配列の相違を利用して、腸内細菌叢を分析することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

請求項1に係る発明は、被験者の腸内細菌叢を分析する方法であって、被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を特定のPCRプライマーを用いて増幅させる核酸増幅工程と、前記核酸増幅工程において得られた増幅断片に基づき腸内細菌叢を分析する分析工程とを含むことを特徴とする。

【0010】

請求項2に係る発明は、請求項1の発明において、前記分析工程には、前記増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、前記分画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含むことを特徴とする。

【0011】

請求項3に係る発明は、請求項1の発明において、前記分析工程には、複数のプローブを用いて前記増幅断片とハイブリッド形成を行わせ、その形成の有無から腸内細菌叢の分析が行われることを特徴とする。

【0012】

請求項4に係る発明は、請求項3の発明において、前記プローブは、検出部中の特定の位置に配置されていることを特徴とする。

【0013】

請求項5に係る発明は、請求項4の発明において、前記核酸増幅工程で用いた

PCRプライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとすること特徴とする。

【0014】

請求項6に係る発明は、請求項4の発明において、前記核酸増幅工程において得られた核酸は、前記検出部への導入前に変性せしめることを特徴とする。

【0015】

請求項7に係る発明は、請求項4の発明において、前記検出部の設定温度は、温度制御部からの命令により任意に変更できることを特徴とする。

【0016】

請求項8に係る発明は、請求項1～7のいずれかの発明において、前記特定のPCRプライマーが、前記腸内細菌の16S rRNAをコードした核酸領域を増幅し得る配列を有していることを特徴とする。

【0017】

請求項9に係る発明は、請求項1～7のいずれかの発明において、前記特定のプライマーが特定の増幅確率を有するプライマーであることを特徴とする。

【0018】

請求項10に係る発明は、腸内細菌叢を分析するための装置であって、被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、前記増幅された核酸を電気泳動により分画する電気泳動部と、前記電気泳動部において分画された泳動パターンから腸内細菌叢を解析する解析部とを有することを特徴とする。

【0019】

請求項11に係る発明は、腸内細菌叢を分析するための装置であって、被験者から採取した試料中の腸内細菌群の核酸を増幅させる核酸増幅部と、前記増幅された核酸と特定のプローブとをハイブリッド形成させるハイブリッド形成部と、前記ハイブリッド形成の結果から腸内細菌叢を解析する解析部とを有することを特徴とする。

【0020】

請求項12に係る発明は、請求項7の発明において、前記ハイブリッド形成部

には、腸内細菌群由来の核酸からなるプローブが配列されたDNAチップが備えられていることを特徴とする。

【0021】

請求項13に係る発明は、請求項11の発明において、前記ハイブリッド形成部には、腸内細菌群由来の核酸からなる特定のプローブが特定の位置に配置された検出部が備えられていることを特徴とする。

【0022】

請求項14に係る発明は、請求項13の発明において、前記核酸増幅部で用いたPCRプライマーで各腸内細菌から増幅された核酸をプローブとすること特徴とする。

【0023】

請求項15に係る発明は、請求項13の発明において、前記検出部の前段には、核酸を変性せしめるDNA変性部を設けることを特徴とする。

【0024】

請求項16に係る発明は、請求項13の発明において、前記検出部の設定温度を任意に変更できる温度制御部を備えることを特徴とする。

【0025】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の好適な実施形態を図面を用いて説明する。

[第一の実施形態]

図1は、第一の実施形態の腸内細菌叢の分析方法の工程図を模式的に示す。

(1) 試料の調製

図1において、被験者から試料、例えば糞便を採取し(S01)、この試料を生理食塩水等に懸濁する。この懸濁液は、その後、フィルターなどに通されて、細菌以外の不要な細胞などの固体が除去され、細菌群懸濁液が調製される(S02)。

【0026】

この細菌の分離回収に用いるフィルターは、細菌とそれ以外の個体とを分離し得るサイズのものであれば特に限定はない。また、好適には、このフィルターと

して、径の異なる複数のフィルターを用い、粗い目のものから細かな目のフィルターを順次通すことにより、フィルターの目詰まりを低減させることができる。例えば、目の粗いフィルターとしてストマフィルター（ゲンゼ産業）を、目の細かいフィルターとしてポリプロピレンスクリーン $80\mu\text{m}$ 、 $45\mu\text{m}$ 、 $25\mu\text{m}$ （MILLIPORE）、ミニザルト $5\mu\text{m}$ （sartorius）などのメンブランフィルターを組み合わせて好適に利用することもできる。

（２）特定DNAのPCRによる増幅

前記分離された細菌は、細菌懸濁液として回収され、これを用いてDNA抽出が行われる（S03）。このDNA抽出は、例えば、current protocol in molecular biology, p2.4.1-2.4.5 (Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York) に従って実施し、最終的に緩衝液（例えば Tris-HCl 緩衝液など）に懸濁されて、この核酸懸濁液が調製される。

【0027】

より具体的には、細菌懸濁液を例えばマイクロチューブなどに注入し、遠心する。遠心後、上清を除き、得られたペレットを SDS 及びプロテイナーース K 含有 TE バッファ等に再懸濁する。再懸濁液を 37°C で 1 時間インキュベートして溶菌させる。インキュベート後、懸濁液に 5 M 塩化ナトリウム溶液を添加し、混合する。混合後、CTAB (hexadecyltrimethyl ammonium bromide) / 塩化ナトリウム溶液を添加して、 65°C 、10 分間インキュベートする。

【0028】

クロロホルム／イソアミルアルコール溶液を同量添加後、5 分間遠心し菌体を沈殿させる。得られた上清を別のチューブなどに移し、フェノール／クロロホルム／イソアミルアルコールを添加し、遠心して、上清を回収して除蛋白処理を行う。

【0029】

回収した上清は、さらに別のチューブに移し、イソプロパノールを添加して、核酸を沈殿させる。沈殿した核酸を 70 % エタノールで洗浄し、上清を除去して、沈さを軽く乾燥させる。この沈さを TE バッファで再懸濁して核酸懸濁液とする。

【0030】

調製された核酸懸濁液を用いてPCRが実施される（S04）。このPCRにおいて増幅させる核酸としては、細菌間で配列が相違し、その配列に基づいて細菌を識別し得る領域、例えば、細菌の16SrDNAなどを挙げることができる。

【0031】

この16SrDNAは、細菌間でわずかに配列が相違し、また、配列に基づいた系統樹なども作られていることから（Christineら、前掲）、この16SrDNAに基づけば、後の分析工程において、細菌の特定をも行うことが可能となる。

【0032】

従って、ここで用いられるPCRプライマーは、前記において選択された特定領域を増幅し得るものであればよく、例えば、前記16SrRNAを増幅し得るプライマーとしては、配列番号1と2とのプライマー対又は配列番号1と3とのプライマー対が好適に用いることができる。また、配列番号4及び5のプライマー対も、16SrRNAを増幅し得るプライマーとして好適に用いることができる（Microbes and Environments 12:57-68）。さらに、配列番号6及び7のプライマー対を用いてもよい。（「腸内フローラと腸内増殖」, Proceedings of 3rd Symposium on Intestinal Flora, Tokyo, 1994, 学会出版センター）。

【0033】

また、PCR反応液は、例えば、前記Christineら（前掲）に従って調製することができる。具体的には、前記核酸懸濁液の一部に、PCR用のバッファを添加し、また、最終濃度、3mM塩化マグネシウム、5%DMSO、各0.1mMdNTP、0.5U Taq酵素となるように各酵素を添加して反応液を調製する。

【0034】

PCRの反応条件は、例えば、94℃で7分間保温することにより、鋳型DNAを十分に変性させ、その後、変性工程（94℃、1分間）、アニーリング工程（54℃、1分間）、伸長工程（72℃、1分間）の3工程を35サイクル繰り返す。

返し、最終的に10分間、72℃に保温して伸長工程を実施する。

(3) 増幅断片の電気泳動による分画

前記PCR反応液の一部を用いて、電気泳動を実施し(S05)、増幅断片の分画を行う。この電気泳動は、通常のアクリルアミドゲル又はアガロースゲルを用いた電気泳動を採用してもよいが、前記16S rDNAのようにわずかに塩基配列が異なった増幅断片が複数反応液中に含まれ、これら増幅断片を識別可能とする場合には、温度グラディエント電気泳動を利用することが好ましい。

【0035】

このグラディエント電気泳動は、例えば、8M尿素、20%ホルムアミドを含有した6%アクリルアミドゲルを準備し、予め、ゲルに39～52℃の温度グラディエントを形成させておく。そして、このゲルに前記PCR反応液を載せ、39℃から52℃までの温度グラディエントが形成された状態で、100V、17時間泳動を行う。

【0036】

最終的に、電気泳動後の泳動(分画)パターンをエチジウムブロマイド染色などにより視角化して、コンピュータにより読み取らせ、この分画パターンに基づいて、次の腸内細菌叢の分析が行われる。

(4) 腸内細菌の分析

前記分画パターンの分析は、例えば、前記と同一の条件で各腸内細菌の16S rDNAを分画し、その分画パターンをデータベースに記録する。そして、このデータベース上のデータと前記被験者の分画パターンと対比して(S06)、腸内細菌叢に含まれる細菌の種類を直接同定することもできる(S07)。この際、予め、病気や老化に関係のある細菌が同定されている場合には、その細菌の有無を判定してもよい。

【0037】

または、各腸内細菌と増幅断片との関係が対応付けされていない場合には、定期的に測定された被験者の腸内細菌叢を示す分画パターンをデータベースに記録しておき、そのデータベース上の分画パターンと対比して、腸内細菌叢の変化を検出することもできる。そして、ここで検出された新たな増幅断片などに基づき

、疾患や、不調時等に関連する腸内細菌を調べることができる。

(5) 応用

図2には、本腸内細菌叢の分析方法の応用例として、一人の被験者の健康状態を腸内細菌叢に基づきモニターする場合を示す。

【0038】

上述した一連の操作により、被験者の腸内細菌叢を定期的に調べ、良好な健康状態における、腸内細菌群の16S rDNA等の増幅断片の分画パターンを記録する。そして、被験者が身体において不調を感じるようになった場合にも、前記一連の操作により同様に腸内細菌群における16S rDNAの分画パターンを継続して調べる。この「不調時」分画パターンと前記「良好時」の分画パターンを比較し、不調時に生じるバンド又は消失するバンドの有無及びバンドの強度の変化等を判定する。

【0039】

また、体調が回復している時期にも継続して腸内細菌叢の分析を行う。そして、不調時に生じているバンドが消失するか、良好時に特徴的なバンドが出現又は、バンド強度が高まるかなどがモニターされる。

【0040】

例えば、図2を用いて説明すると、バンドeは不調時又は不調となる直前に出現し、また、バンドbは、不調となると出現し、この不調状態が継続するにつれてバンド強度が高くなることが示されている。また、「回復時」には、再びバンドeは消失し、これに変わって良好時に特徴的なバンドbが出現する。このように、体調変化に伴った腸内細菌群の特有の分画パターン変化を検知することにより、体調の変化を検知することが可能となる。

【0041】

このように腸内細菌叢は、健康状態、ストレスなどにより変化すると考えられていることから、この腸内細菌叢の分析は、血液検査などから検知することができない微妙な健康状態の変化を検知し得る手段として健康診断などに利用することが期待される。特に、腸内細菌叢はストレスなどの精神的な要因によっても変化することから、精神的な要因から生じる身体への影響を早期に検出することに

も利用されることが期待される。

【0042】

また、前記図2に示すような判定結果から健康状態を示す腸内細菌由来のバンドパターンを特定することができると共に、不調時に出現する増幅バンドから不調時に関連する腸内細菌を同定することもできる。また、このような腸内細菌の人体への影響などの研究などにもつなげることが可能となる。

【0043】

さらには、図2に示す通り、この腸内細菌叢の分析方法は、薬剤などを投与した時に、その薬剤が与える腸内細菌叢への影響を調べる場合にも利用し得る。

〔第二の実施形態〕

前記第一の実施形態は腸内細菌の特定領域を指標に細菌群を検出し、細菌叢を分析する方法を示したが、本実施形態では、染色体の任意の領域を対象として、細菌群を検出し、腸内細菌叢を分析する方法を示す。

【0044】

なお、第二の実施形態でも、被験者から採取した試料から細菌懸濁液を調製する点、調製された細菌懸濁液から核酸懸濁液を調製する点は同様であるため、ここではその説明を省略する。

(1) 腸内細菌群の任意領域のPCR増幅

第二の実施形態では、染色体の任意の領域を対象として増幅断片を合成し、この合成された増幅断片に基づいて細菌群を検出する。このような種々の細菌の任意の領域を増幅し得るプライマーとしてランダムPCRのプライマーなどがあるが、一般のランダムPCRプライマーでは、非常に多くの増幅断片が合成され、電気泳動により分画した際に、バンド間が接近してパターンの読み取りが困難になる場合がある。そのため、ここでは、特定の増幅確率を有するプライマーを用い、腸内細菌群の任意のDNA断片を増幅することとする。

【0045】

この特定の増幅確率を有するプライマーは、前記所定の鋳型核酸の塩基長に対し限定された種類数のDNA断片を増幅し得るプライマーを意味する。このように特定の増幅断片を合成し得るプライマーを用いることにより、その後の電気泳

動において分画パターンの読みとりを容易にすることができる。

【0046】

具体的には、ここで用いることができるプライマーの増幅確率は特に限定はないが、増幅されたDNA断片を電気泳動により分画し精度よく解析し得るためには、増幅断片の数が25本以下であり、また、多数の腸内細菌群を効率よく解析するためには、増幅断片の数は、少なくとも10程度とすることが好ましい。

【0047】

一方、細菌の染色体長さは、 $8 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ bpであり (Molecular Biology of the Cell, third edition, p.340)、腸内細菌群の染色体遺伝子を平均 5×10^6 bpと仮定する。また、腸内細菌はおよそ100種類程度存在すると考えられていることから、腸内細菌群全体として塩基長は、 5×10^8 bpと仮定される。このような鑄型に対して、 5×10^7 bp当たり1本の増幅断片を合成し得る増幅確率を有するプライマーを用いれば、およそ10種類程度の増幅バンドが生成され、この増幅バンドが異なる細菌に由来すると10種類の細菌を調べることが可能となる。

【0048】

従って、前記計算によれば、100種類の腸内細菌を調べるためには、例えば 5×10^{-7} の増幅確率を有するプライマーを少なくとも10種類用いる必要がある。さらに、細菌により塩基配列の偏りを考慮すれば、 5×10^{-7} の増幅確率を有するプライマーを50種類程度、より確実には100種類程度のプライマーを用いることが好ましい。

【0049】

なお、このプライマーの増幅確率は一例であり、増幅確率を 5×10^{-7} に限定されるものではない。従って、実験操作などにより所望の増幅確率を選択し、それに対応して、プライマーの種類を増減させることができる。

【0050】

また、この増幅確率を求めるには、多数の種類の核酸が混在している溶液等、例えば、複数の腸内細菌由来の核酸が含有されている核酸懸濁液を鑄型として、種々のプライマーを用いて、それぞれのプライマーにおける増幅断片の生成数を

調査する。そして、この調査結果から各プライマーの増幅確率を求め、その中から所望の増幅確率を有するプライマーを選択する。この調査に用いることができるプライマーの候補としては、井上ら（「SSC-PCR法によるポピュレーションダイナミクスの研究」、第2回日本水環境学会シンポジウム講演集（平成11年）、p54～55、日本水環境学会）による5'-GGCTTCGAATCG-3'（配列番号8）、5'-TGGATCTTTGAG-3'（配列番号9）、5'-AAGATCTCGGGG-3'（配列番号10）など、また市販のプライマーとしては、DNAオリゴマー（ニッポンジーン社製）などを用いることができる。

（2）PCRの条件

PCR反応溶液の組成は、1×PCR用バッファ、1.5mM MgCl₂、200μM dNTP mix、2μMプライマー、0.0125ユニット/μL Taqポリメラーゼとすることができる。また、鋳型DNAは、前記第一の実施形態における核酸懸濁液を用いることができる。

【0051】

また、PCR反応条件は、94℃1分、45℃2分、72℃3分とすることができる。この場合の反応サイクルは、例えば、35サイクルとすることができる。但し、この条件等は、例示であるため、この条件を変更することは可能である。

（3）DNA断片の増幅方法及び電気泳動による解析

例えば、マイクロタイタプレートの各ウェルに異なる増幅確率を有するプライマー、例えば 5×10^{-7} の増幅確率を有するプライマーを添加し、前記核酸懸濁液と混合する。そして、表1に示すようにPCRバッファ、塩化マグネシウム、dNTPミックス、Taqポリメラーゼを添加して、反応液を調製する。

【0052】

【表 1】

最終濃度	
バッファ	
Tris-HCl (pH 8.3)	10 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP mix	200 μ M
プライマー	2 μ M
染色体DNA	10 pg/ μ L
Taq DNAポリメラーゼ	0.025 u/ μ L

【0053】

反応液調製後、PCR増幅器にセットし、前述の反応条件でPCRを実行する。なお、この増幅器は、特に限定はなく、通常市販されている増幅器を使用することができる。

【0054】

増幅反応終了後、反応液の一部が電気泳動にかけられ、増幅断片が分画される。この電気泳動の条件等は、解析するDNA断片の数や長さにより、適切なものが使用される。例えば、アガロースゲルを用いた電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動などを用いることができる。また、分画するDNA断片の長さに幅がある場合には、ロングレンジ型ゲル及び装置を用いることができる。

【0055】

電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド染色等により増幅断片の分画パターンを視角化し又はコンピュータなどにより読み取る。最終的に、この分画パターンに基づいて、次の被験者の通常の腸内細菌叢が分析される。

(4) 分画パターンに基づき腸内細菌叢の分析

腸内細菌叢の分析には、可能であれば、図3に示すように、前記分析に使用される同一のプライマーを用い同一のPCR条件で、各腸内細菌の染色体を増幅させ、その増幅断片の泳動パターンをデータベース1に記録したものを準備する。

【 0 0 5 6 】

このデータベース 1 中のパターンと、被験者の試料から得られ泳動パターン 2 とを照合して、細菌を同定し、腸内細菌叢を分析する。

【 0 0 5 7 】

または腸内細菌叢の分析には、図 3 に示すように各腸内細菌の分画パターンを記録したデータベースが準備できない場合にも、予め定期的に被験者の腸内細菌叢の状態を示す分画パターンを記録し保存しておくことが好ましい。そして、記録された腸内細菌群の分画パターンと対比し、健康状態が良好な時の分画パターンと一致するか、若しくは、良好な時の分画パターンとは一致せず、腸内細菌叢において変化が生じているかを分析し、健康状態をモニターすることもできる。

【 0 0 5 8 】

このように、本実施形態においても、この分析の結果、不調時に出現する特有の増幅バンドから、不調時に増殖又は減少し易い腸内細菌を同定してもよく、またこの第二の実施形態を用いて投薬時に与える腸内細菌群への状態を調べることもできる。

【 0 0 5 9 】

なお、上述した第一又は第二の実施形態では、増幅断片を電気泳動で分画し、その分画パターンから腸内細菌叢を分析する場合を説明したが、これ以外にハイブリダイゼーション法を用いてもよい。この場合、プローブには、腸内細菌群を分類等し得るプローブを用いることができる。例えば、第一の実施形態において各腸内細菌由来の 1 6 S r D N A の特徴的な領域を有するプローブ群を、また、第二の実施形態では、特定の増幅確率を有するプライマーにより増幅され得る断片に相補的な配列を有するプローブ群を用いることができる。そして、これらプローブ群と各増幅断片とハイブリダイゼーションを行い、ハイブリッド形成の有無に基づいて、各増幅断片と腸内細菌の種類とを対応づけて腸内細菌叢を分析してもよい。

【 0 0 6 0 】

特にドットプロットハイブリダイゼーションによれば、処理能力を向上させることができ、また、後述する D N A チップを用いることにより、さらなる処理能

力の向上が図られる。

【0061】

これらドットプロットハイブリダイゼーション及びDNAチップを用いたハイブリッド形成解析では、特定のドット又は特定のチップ上の区画におけるハイブリッド形成の有無から腸内細菌叢を構成する細菌の種類を特定することができれば望ましいが、細菌の種類が特定することができない場合でも、DNAチップ等のハイブリッドの形成のパターン変化から腸内細菌叢の変化を検出してもよい。そして、この分析から、被験者の不調時等にシグナルが出現するドット又は区画上のプローブを用いて、「不調時」等に関連する腸内細菌等を特定してもよい。

【第三の実施形態】

本実施形態では、前記第一又は第二の実施形態の腸内細菌叢を分析方法を実行し得るシステム構成を図4を用いて説明する。

【0062】

図4において、システム10には、被験者から採取した糞尿などの試料から細菌を抽出する細菌自動抽出部12が備えられている。この細菌自動抽出部12は、生理食塩水が収容され、この生理食塩水に試料を懸濁させる。また、この細菌自動抽出部12は、調製された懸濁液から細菌以外の固体を除去するために、内部にフィルタが備えられ、このフィルタにより、細菌のみを分離し、細菌懸濁液を調製する。細菌の回収時におけるフィルタの目詰まりを防止するために、このフィルタは、好ましくは目の粗いフィルタから目の細かいフィルタを備えることが好ましい。例えば、目の粗いフィルタとしてストマフィルタ（グンゼ産業）を、目の細かいフィルタとしてポリプロピレンスクリーン80 μ m、45 μ m、25 μ m（MILLIPORE）、ミニザルト5 μ m（sartorius）などのメンブランフィルタを組み合わせ好適に利用することもできる。

【0063】

前記細菌自動抽出部12には、この細菌自動抽出部12において調製された細菌懸濁液が移送される移送ライン13を介して、DNA自動抽出部14が接続されている。このDNA自動抽出部14には、細菌からDNAを抽出するための試

薬など備えられ、細菌からDNAが抽出され、DNA懸濁液が調製される。なお、このDNA自動抽出部は、市販されているDNA自動抽出器などを利用してよい。

【0064】

前記DNA自動抽出部14には、調製されたDNA懸濁液を移送するための移送ライン15を介して、PCR反応部16が接続され、このPCR反応部16において、PCR反応液の調製及びPCR反応が実行される。そのため、このPCR反応部16には、腸内細菌叢を分析するためのPCRプライマーと、その他のPCR反応液を調製するための試薬（緩衝液、dNTP、ポリメラーゼ、塩化マグネシウムなどの塩類等）が収容され、移送ライン15を介して移送されたDNA懸濁液に、試薬が添加されてPCR反応液が調製される。このPCR反応液の調製後、操作者の所望の条件でPCR反応が実行される。

【0065】

なお、このPCR反応部16におけるプライマーは、対象とする増幅領域に対応させて選択することができる。例えば、第一の実施形態に示したように、腸内細菌の特定領域として16SrDNAを増幅させる場合には、配列番号1、2のプライマー対、配列番号1、3のプライマー対又は配列番号4、5のプライマー対を選択することができる。また、腸内細菌の任意の領域を対象としてDNA増幅を行う場合には、第二の実施形態における所望の増幅確率を有するプライマーから用いることができる。

【0066】

PCR反応部16には、電気泳動部18が接続され、この電気泳動部18では、PCR反応部16における反応液を電気泳動ゲル内で泳動させ、反応液中の増幅断片を分画する。なお、このPCR反応部16と電気泳動部18とは複数のキャピラリー17により接続することができる。そして、これらキャピラリー17の先端は、電気泳動部18における電気泳動ゲル（図示せず）の各レーンに接続させ、各PCR反応液がそれぞれ電気泳動ゲルの各レーンに注入されるように構成することができる。

【0067】

前記電気泳動部 18 には、信号線 19 を介して解析用コンピュータ 20 が接続される。この解析用コンピュータ 20 では、電気泳動部 18 において分画された分画パターンを読み取り、ここで読みとられた分画パターンが解析される。

【0068】

この分画パターンの解析のために、解析用コンピュータ 20 には、データベース 22 が接続されている。~~このデータベースには、例えば、各腸内細菌由来の 16 S r DNA などの特定領域に対する分画パターンデータ、第二の実施形態に示した特定の増幅確率を有するプライマーを用いた場合の各細菌の分画パターンデータ又は被験者の定期的な検査における分画パターンデータなどが記録される。~~

【0069】

そして、これらデータベース上の分画パターンと電気泳動部 18 から得られた分画パターンとを解析用コンピュータ 20 において対比させ、腸内細菌叢の解析が行われ、腸内細菌の特定、腸内細菌叢に変化があるか、又は「良好時」もしくは「不調時」の腸内細菌叢と一致するか等が判定される。

【0070】

最終的に判定された判定結果を表示等するために、解析用コンピュータ 20 には、表示部 24 に接続され、この表示部において判定結果の表示及び出力が行われる。

【0071】

このように本システムでは、前記第一の実施形態又は第二の実施形態に示す腸内細菌叢の分析方法が実施され、被験者から採取された腸内細菌群の核酸に基づき、腸内細菌叢が分析される。従って、本システムでは、従来のような各腸内細菌に対応させて培養するような手間と、培養時間を削減することができる。

[第四の実施形態]

第四の実施形態では、腸内細菌叢を分析するための他のシステム 25 を示す。前記第三の実施形態のシステムでは、電気泳動部 18 を備え、増幅断片を電気泳動により分画していたが、この電気泳動による分画工程の代替として、図 5 に示すように、前記電気泳動部 18 に代えて、例えば、ハイブリッド解析部 26 を備えることもできる。

【0072】

このハイブリッド解析部26には、例えば、DNAチップなどを備え、このDNAチップ等には、腸内細菌叢の分析に用いるプライマーにより増幅され得る各腸内細菌由来のDNA領域、例えば、16SrDNA領域や、所望の増幅確率を有するプライマーにより増幅され得るDNA領域が独立して固定される。そして、このDNAチップ等に、前記PCR反応部16において増幅された増幅断片を変性させた後、接触させて、ハイブリッド形成を行わせる。

【0073】

なお、このDNAチップの作製等については、情報処理、vol40(1990年3月)，p323-325に従って実施することができる。例えば、DNAチップの作製については、予め準備したプローブをチップ基板上に配置させるプローブ配置型、例えば、GEM array (Synteni社製) などでも、また、ガラスやシリコンなどの基板上で直接DNAの伸長反応を用いてプローブDNAを生成させたプローブ合成型、例えば、GeneChip (Affymetrix社製) でもよい。また、簡便には、市販のDNAチップ作製装置及びその読み取りには、DNAチップ読み取り装置(例えば、GMS社製)等を用いてもよい。

【0074】

一方、このようにDNAチップを用いた場合には、データベース30にDNAチップ上の各腸内細菌の位置などを記録しておく。そして、解析用コンピュータ28において、データベース30中のデータに基づき、DNAチップ上のハイブリッドが形成された位置から腸内細菌群を特定し、腸内細菌叢が分析され、分析結果が表示部32に表示される。

【0075】

または、ハイブリッド形成の有無から腸内細菌叢を構成する細菌の種類を特定することができない場合には、健康状態について「良好時」と「不調時」との間等におけるDNAチップ上でのハイブリッド形成のパターン変化に基づき、腸内細菌叢の変化を検出することもできる。そして、この分析結果から、被験者の不調時等においてハイブリッド形成が観察される区画上のプローブを用いて、「不

調時」等に関連する腸内細菌等を特定してもよい。

【0076】

このように電気泳動部に代えて、ハイブリッド解析部26を備え、ハイブリッドの形成の有無により、細菌を同定することが可能となれば、より操作が簡便になる。

【0077】

また、細菌懸濁液から調製される核酸懸濁液が、DNAチップなどを用いて腸内細菌叢の分析に必要な量のDNAが含まれている場合には、図6に示すシステム34のように、前記PCR反応部を省略して、DNA自動抽出部14とハイブリッド解析部26とを直接接続してシステムを構成してもよい。

【第五の実施形態】

第五の実施形態では、腸内細菌叢を分析するための他のシステム40を示す。

【0078】

第五の実施形態の腸内細菌叢の分析方法を実行し得るシステム構成を図7を用いて説明する。

【0079】

図7において、PCR反応部16は、チューブを介して、電磁弁43、DNA変性部44、及び検出部45に接続され、PCR反応部16の反応液は最終的に排出口からシステム40の外部に排出されるように構成されている。電磁弁42はPCR反応部16とDNA変性部44との間に設けられ、この電磁弁43の切り換えにより洗浄液41、或いは色素（例えば、エチジウムブロマイド）を検出部45（後述する。）に送出させることができる。

【0080】

検出部45は、Pr1用細菌検出管45a、Pr2用細菌検出管45b、及びPr3用細菌検出管45cから構成されており、各検出管45a～45cのプロープ担持体には腸内細菌叢の分析に用いるプライマーにより増幅され得る各腸内細菌由来のDNA領域、例えば16SrDNA領域や、所望の増幅確率を有するプライマーにより増幅され得るDNA領域が独立して固定されている。

【0081】

このDNA領域のプローブ担持体への固定手法としては、

(1) プローブ担持体にフィルターを用いる手法

ニトロセルロース膜(フィルタ)からなるプローブ担持体を所定温度に加熱処理したり、またナイロンメンブランからなるプローブ担持体を紫外線照射する、

(2) 化学的結合手法

~~プローブ担持体とプローブをチオール分子等を介して結合する、~~

(3) ビオチン化手法

ビオチンを用いる、

等の種々の手法が確立されているが、本発明はこれらの手法に限定されるものではない。

【0082】

温度制御部47はDNA変性部44、検出部45の温度を任意に設定できる。この温度制御によりDNA変性部44でのDNAの変性割合、及び検出部45でのハイブリッド形成状態の割合を制御することが可能になる。

【0083】

光源48は検出部45に可視光、或いは紫外光を照射し、一方CCDカメラ49は検出部45でのハイブリッド形成状態を蛍光、発光等の光強度として捉え、その光学的データを後段の解析用コンピュータ50に送出し、この解析用コンピュータ50で腸内細菌を検出することによって同定する。

【0084】

検出部45でのハイブリッド形成状態を蛍光、発光等の光強度として捉えるには次の手法を用いることが好ましい。

(1) プライマーの蛍光色素修飾

DNAに色素を修飾したプライマーを使用する、

(2) 2本鎖DNA染色試薬エチジウムブロマイド、SYBR Green (日本ジーン試薬) によるハイブリダイズにより2本鎖となったDNAを染色する、

(3) DIG (BOEHRINGER MANNHEIM社)、ECL (Amersham Pharmacia社) の使用

(4) 蛍光プラズモン共鳴法、水晶振動子による質量変化測定法の使用

次に、第五の実施形態におけるシステム40の分析方法を図8の処理工程図に従って説明する。

【0085】

図8において、第二の実施形態で示したPCR反応条件の下でPCRを実行する(S10)。本実施形態では、3種類のプライマー(Pr1、Pr2、Pr3)を用いた。

【0086】

この後、電磁弁43を調整して、チューブ内に注入したPCR反応液がDNA変性部44に流入するようにする(S11)。

【0087】

DNA変性部44では、温度コントロール47によって所定温度まで昇温せしめて、DNAを変性させる(S12)。

【0088】

変性されたDNAはチューブを介して検出部45の各プライマーに連通する、Pr1用細菌検出管45a、Pr2用細菌検出管45b、及びPr3用細菌検出管45cに導入される(S13)。

【0089】

温度制御部47は、Pr1用細菌検出管45a、Pr2用細菌検出管45b、及びPr3用細菌検出管45cを所定温度に設定することによって、各検出管内の変性されたDNAをハイブリダイゼーションし易くする(S14)。

【0090】

ここで、蛍光色素修飾を用いる場合には、エチジウムブロマイド42を電磁弁43を介してPr1用細菌検出管45a、Pr2用細菌検出管45b、及びPr3用細菌検出管45cに注入する(S15)。これによって、ハイブリダイゼーションされていると、光源48からプローブ担持体に光を照射すると蛍光し、この蛍光度等の光強度を画像データとしてCCDカメラ49によって取得することができる(S16)。

【0091】

得られた画像データは、解析用コンピュータ 50 に送出され、プローブ担持体 46 の設置データと比較され、細菌を同定（検出）する（S17）。

【0092】

尚、ステップ S15 では、色素を用いる例を挙げたが、これには限られず、検出部 45 のハイブリッド形成状態を捉えることができる他の手法を適用することができるため、場合によってはステップ S15 の処理を割愛しても良い。

【0093】

また、システム 40 を繰り返して使用する場合には、電磁弁 43 を調整することにより洗浄液 41、例えば水酸化ナトリウム溶液を検出部 45 に送出することにより、一旦ハイブリッド形成された DNA を解放することが可能である。この他、温度制御部 47 によって検出部 45 の温度を制御することによっても更にハイブリッドされた DNA の解放を促進させることが可能となる。

【0094】

【発明の効果】

以上の通り、本発明によれば、腸内細菌群の染色体に基づいて、腸内細菌群を検出することとしていることから、従来のように腸内細菌毎に対応した培養を行うことなく、腸内細菌叢を分析することができる。従って、腸内細菌叢の分析が容易になり、これによって健康管理などを腸内細菌叢の変化等に基づいて行うことが可能となる。また、疾患、老化などの身体の状態に關与する腸内細菌の同定などにも利用することが可能となる。

【0095】

前記発明によれば、特定の PCR プライマーにより腸内細菌の核酸が増幅され、その増幅断片に基づいて遺伝学的手法から腸内細菌叢を分析するため、従来のような各腸内細菌の培養条件に対応させた煩雑な培養操作を行うことなく、同一の操作で複数の腸内細菌を検出することができる。

【0096】

前記分析工程では、前記増幅断片を電気泳動で分画する分画工程と、前記分画工程において得られた分画パターンを分析する分析工程とを含めることができる。または、特定のプローブ群を用いて前記増幅断片とハイブリッド形成を行わ

せ、その形成の有無から腸内細菌叢の分析を行うこともできる。

【0097】

前記発明によれば、16S rRNAをコードした核酸（以下、16S rDNAという）は細菌によって、わずかに異なることが知られていることから（Christineら、前掲）、このDNAを対象として増幅し、その増幅断片を分析することにより、腸内の細菌の分布状態（すなわち、腸内細菌叢）を調べることが可能となる。

【0098】

前記発明によれば、特定の増幅確率を有するプライマーを一種類又はそれ以上用いることにより、試料中の腸内細菌の核酸を簡便に増幅させることが可能となる。なお、前記特定の増幅確率とは、前記プライマーが鋳型核酸を任意に増幅し得るものであり、この場合の増幅される断片数が鋳型核酸の配列長に対してある程度特定されているものをいう。

【0099】

前記発明によれば、核酸増幅部において、特定のプライマーにより腸内細菌の核酸が増幅され、分画部で、増幅された核酸が分画され、この分画パターンに基づいて、解析部において腸内細菌叢の解析が行われる。従って、従来のような各腸内細菌の培養条件に対応させた煩雑な培養操作を行うことなく、腸内細菌の核酸に基づいて比較的短時間で腸内細菌叢を分析することが可能となる。

【0100】

前記発明によれば、電気泳動に代えてハイブリダイゼーションにより腸内細菌叢を解析し得るため、特異性を向上させ、また、ドットハイブリダイゼーションなどによれば、処理能力を向上させることができる。

【0101】

DNAチップの基板上には、多数のプロープが集積されているため、多数のプロープを用いたハイブリッド形成解析を並行して行うことができ、さらなる処理能力の向上が図られる。

【0102】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 2 0

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他 合成DNA

配列

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG 20

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 9

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他 合成DNA

配列

GGCTACCTTG TTACGACTT 19

配列番号 : 3

配列の長さ : 1 8

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : その他 合成DNA

配列

AAGGAGGTGA TCCAACCG 18

配列番号 : 4

配列の長さ : 2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG 20

配列番号：5

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

GGCTACCTTG TTACGACTT 19

配列番号：6

配列の長さ：32

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

GCGGATCCTG CAGGAGTTTG ATCCTGGCTC AG 32

配列番号：7

配列の長さ：31

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

GCCTCGAGCG GCCGCTACCT TGTTACGACT T 31

配列番号：8

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

GGCTTCGAAT CG 12

配列番号：9

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

TGGATCTTTG AC 12

配列番号：10

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：その他 合成DNA

配列

AACATCTCCG GG 12

【図面の簡単な説明】

【図 1】

第一の実施形態の腸内細菌叢の分析方法の操作を模式的に示した図である。

【図 2】

第一の実施形態の腸内細菌叢の分析結果を模式的に示した図である。

【図 3】

第二の実施形態の腸内細菌叢の分析において、被験者の泳動パターンと、データベース中のパターンデータとの照合を模式的に示した図である。

【図 4】

第三の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

【図 5】

第四の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

【図 6】

第四の実施形態における他の腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

【図 7】

第五の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの構成図である。

【図 8】

第五の実施形態における腸内細菌叢の分析システムの処理工程図である。

【符号の説明】

1 0 … 腸内細菌叢の分析システム

1 2 … 細菌自動抽出部

1 4 … DNA 自動抽出部

1 6 … PCR 反応部

1 8 … 電気泳動部

2 0 … 解析用コンピュータ

2 2 … データベース

2 4 …表示部

2 6 …ハイブリッド解析部

4 4 …DNA変性部

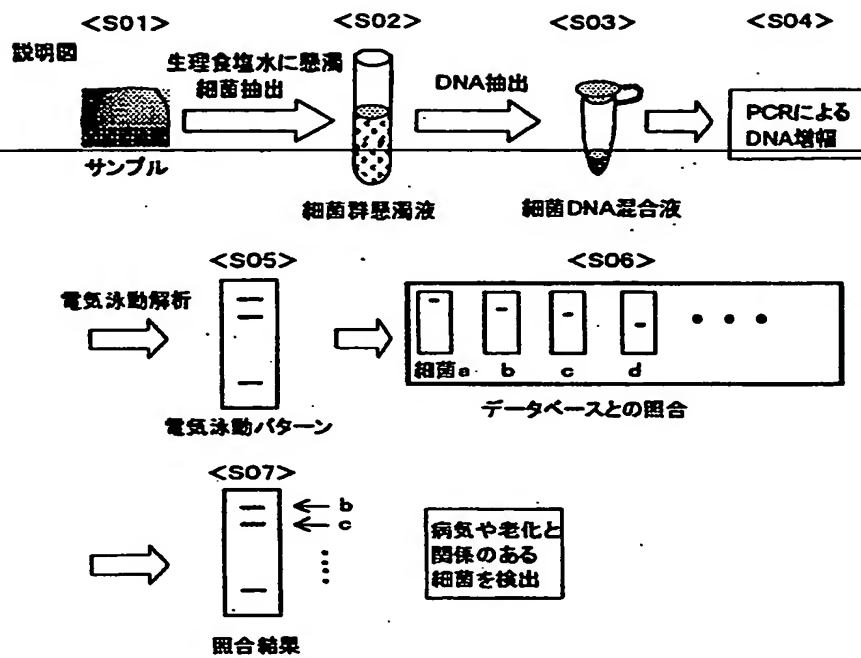
4 5 …検出部

4 6 …プローブ担持体

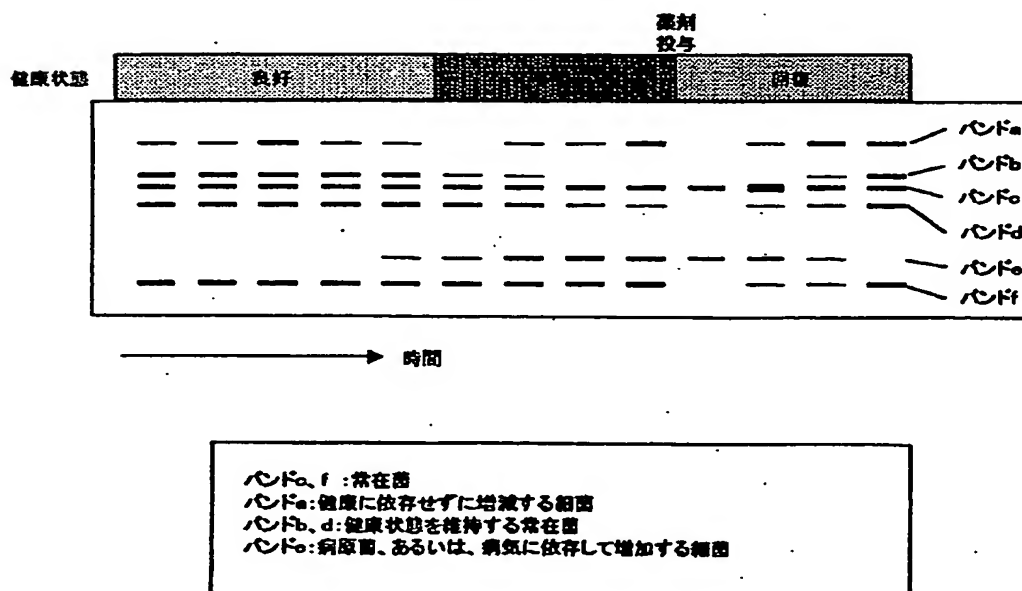
4 7 …温度制御部

【書類名】 図面

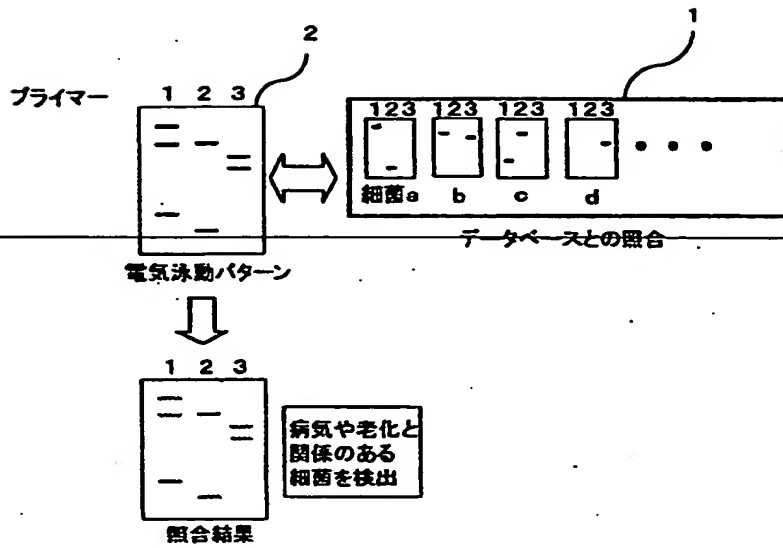
【図1】



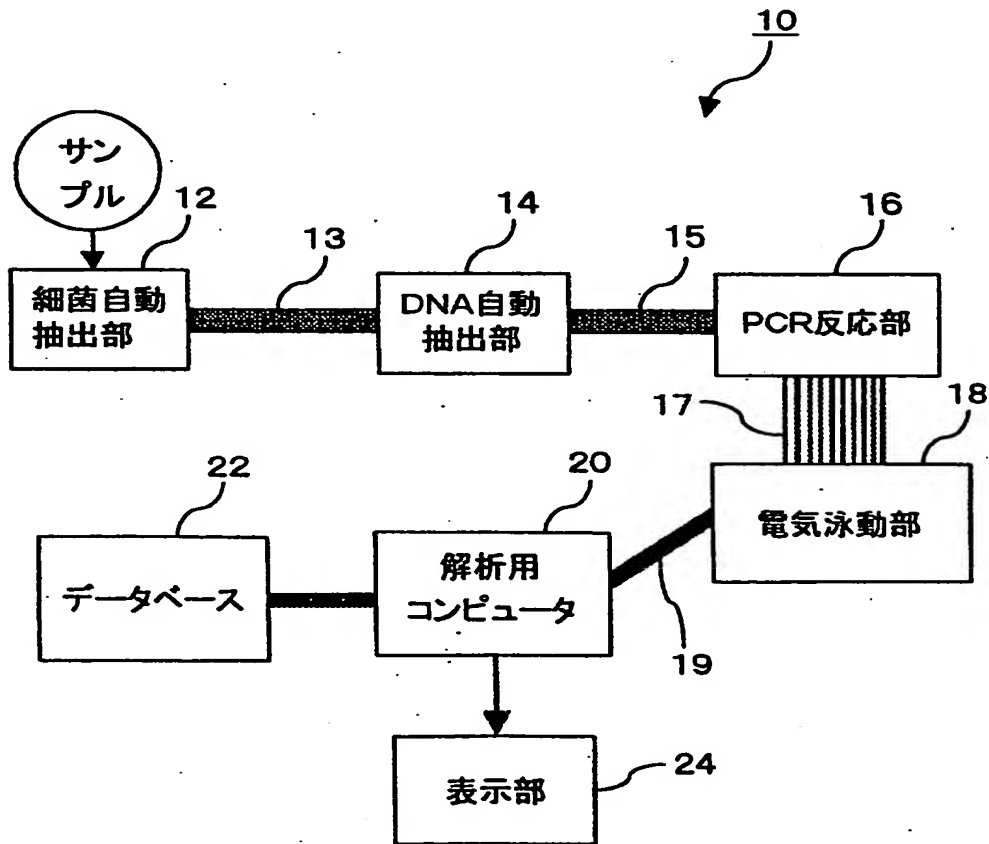
【図2】



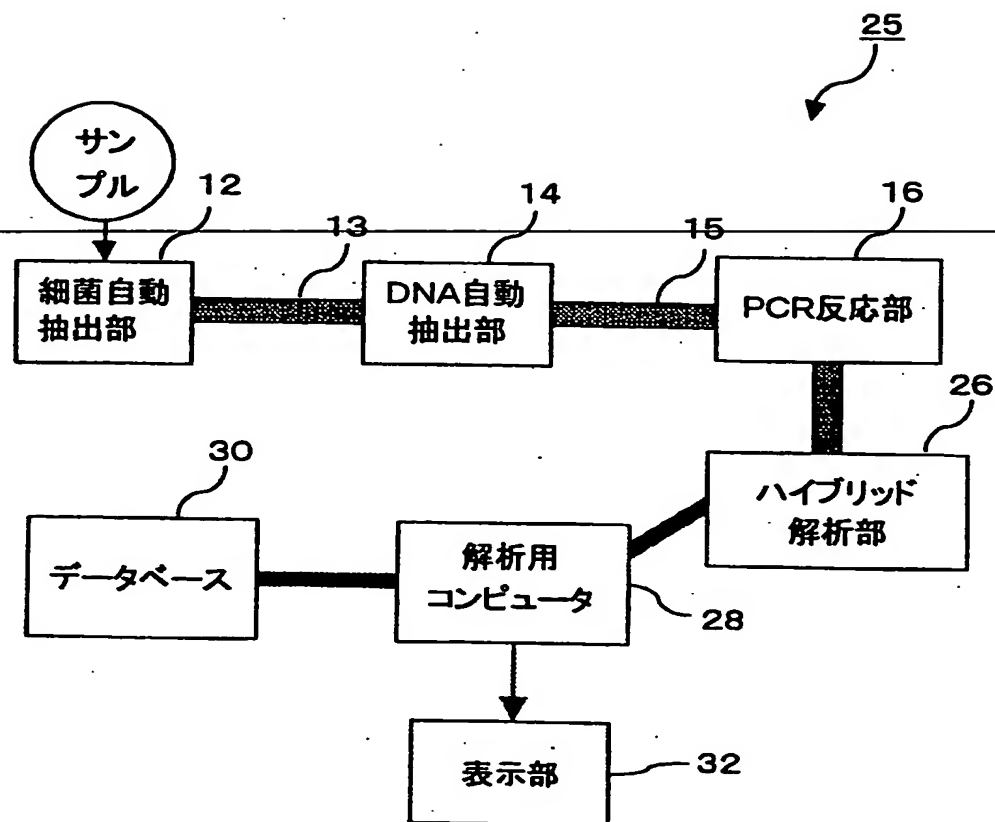
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【図6】

